



Espacenet

Bibliographic data: EP 0338916 (A1)

Haemoglobin macromolecular complexes, method of preparation and their uses.

Publication date:	1989-10-25				
Inventor(s):	DELLACHERIE EDITH; LEONARD MICHELE; SACCO DANIEL; VIGNERON CLAUDE +				
Applicant(s):	MERIEUX INST [FR] +				
Classification:	- international:	A61K38/16; A61K47/48; A61P7/08; C07K14/805; C07K17/06; C07K17/08; C07K17/10; C08F8/00; A61K38/00; (IPC1-7): A61K37/14			
	- European:	A61K47/48K8; A61K47/48R2R; C07K14/805			
Application number:	EP19890401076 19890418				
Priority number(s):	FR19880005240 19880420				
Also published as:	<ul style="list-style-type: none"> • EP 0338916 (B1) • US 5110909 (A) • JP 2042023 (A) • GR 3005220 (T3) • FR 2630329 (A1) • more 				
Cited documents:	FR2600894 (A1)	FR2551660 (A1)	FR2328478 (A1)	DE3501349 (A1)	View all

Abstract of EP 0338916 (A1)

The invention relates to a method of preparation of water-soluble macromolecular conjugates of haemoglobin, wherein: - in a first step, sites Z are bound to a polymer P, the sites Z containing on the one hand at least one negative charge carried, for example, by sulphate groups and intended for creating an ionic bond with haemoglobin, and containing on the other hand at least for example, by a carboxyl group and intended for creating a covalent bond with haemoglobin, - then, in a second step, the polymer P containing the site or sites Z is reacted with haemoglobin in oxygenated form, to form, on the one hand at least one ionic bond between at least one of the sites Z carried by the polymer and the haemoglobin, and on the other hand at least one covalent bond between the abovementioned same site Z carried by the polymer and the haemoglobin.. <??>The macromolecular conjugates obtained by this method possess a lower affinity for oxygen than that of free haemoglobin.

⑫

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

⑰ Numéro de dépôt: 89401076.8

⑸ Int. Cl.: **A 61 K 37/14**

⑱ Date de dépôt: 18.04.89

⑳ Priorité: 20.04.88 FR 8805240

㉑ Date de publication de la demande:
25.10.89 Bulletin 89/43

㉒ Etats contractants désignés:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

㉓ Demandeur: **INSTITUT MERIEUX**
Marcy l'Etoile B.P. 3
F-68752 Charbonnières Cedex (FR)

㉔ Inventeur: **Dellacherie, Edith**
15 rue Jean Ploussard
F-54220 Malzeville (FR)

Leonard, Michèle
471 avenue de la Libération Chaligny
F-54230 Neuves-Maisons (FR)

Sacco, Daniel
Bd Charles V
F-54000 Nancy (FR)

Vignerou, Claude
60 quai Claude le Lorrain
F-54000 Nancy (FR)

㉕ Mandataire: **Grosset-Fournier, Chantal Catherine et al**
SC Ernest Gutmann/Yves Plasseraud 67 boulevard
Haussmann
F-75008 Paris (FR)

㉖ **Conjugués macromoléculaires d'hémoglobine, leur procédé de préparation et leurs applications.**

㉗ L'invention a pour objet un procédé de préparation de conjugués macromoléculaires hydrosolubles d'hémoglobine, caractérisé en ce que :

- on fixe, dans une première étape, des sites Z sur un polymère P, les sites Z contenant d'une part au moins une charge négative portée par exemple par des groupes sulfates et destinée à créer une liaison ionique avec l'hémoglobine, et contenant d'autre part au moins par exemple par un groupe carboxylique, et destiné à créer une liaison covalente avec l'hémoglobine,

- puis dans une seconde étape, on fait réagir le polymère P comportant le ou les sites Z avec de l'hémoglobine sous forme oxygénée, pour former d'une part au moins une liaison ionique entre l'un au moins des sites Z portés par le polymère et l'hémoglobine et d'autre part au moins une liaison covalente entre le même susdit site Z porté par le polymère et l'hémoglobine.

Les conjugués macromoléculaires obtenus par ce procédé présentent pour l'oxygène une affinité inférieure à celle de l'hémoglobine libre.

Description

CONJUGUES MACROMOLECULAIRES D'HEMOGLOBINE, LEUR PROCEDE DE PREPARATION ET LEURS APPLICATIONS

L'invention concerne de nouveaux conjugués macromoléculaires, leur procédé de préparation et leurs applications comme transporteurs d'oxygène, notamment dans le cadre des transfusions.

On sait qu'il est possible d'injecter par voie intraveineuse une solution aqueuse d'hémoglobine exempte de stroma et rendue isotonique du sang.

Or l'un des inconvénients que présente l'hémoglobine est qu'elle ne reste pas dans le circuit sanguin mais qu'elle diffuse à l'extérieur du système vasculaire, en raison en particulier de sa petite taille.

Afin de remédier à cet inconvénient, c'est à dire afin d'augmenter la persistance intravasculaire de l'hémoglobine libre dans le cadre de son utilisation comme "substitut" du sang ou de soluté de remplissage transporteur d'oxygène, plusieurs procédés ont été utilisés.

On a, par exemple, fixé l'hémoglobine à des macromolécules hydrosolubles dépourvues de toxicité, non antigéniques et hémocompatibles.

C'est ainsi que de nombreux exemples d'hémoglobines modifiées par la fixation chimique de polymères hydrosolubles montrent que le temps de séjour de l'hémoglobine dans l'organisme peut être largement augmenté.

Parmi les différents polymères utilisés, les plus courants sont les polysaccharides et notamment le dextrane (brevet français n° 2.328.478) l'hydroxyéthylamidon (brevet français n° 2.328.478), l'inuline (demande de brevet européen n° 43.675), et les polyalkylénéglycols et plus particulièrement le polyéthylène glycol

Cependant dans tous les cas, l'hémoglobine ainsi modifiée par fixation directe de ces polymères, possède des propriétés oxyphoriques mal adaptées à une utilisation en transfusion sanguine.

On rappelle, en effet, qu'un substitut sanguin ne peut jouer un rôle équivalent à celui qu'assume l'hémoglobine intraérythrocytaire native que dans la mesure où la combinaison qu'il forme avec l'oxygène est réversible, c'est à dire qu'il est capable de fixer l'oxygène, (l'hémoglobine est alors sous forme oxygénée) mais également capable de relarguer facilement l'oxygène (l'hémoglobine est alors sous forme déoxygénée).

Cette propriété vis à vis de l'oxygène est caractérisée par la courbe (appelée courbe de Barcroft) qui correspond à la variation de la quantité d'oxygène retenue par unité de masse de transporteur en fonction de la pression partielle de l'oxygène contenue dans l'atmosphère à laquelle l'hémoglobine est exposée.

Dans le cas d'une solution aqueuse de l'hémoglobine native (concentration 15 µmoles/litre) cette variation est représentée par le tracé de référence représenté sur la figure 1, représenté à pH 7.2 à 25°C.

L'un des paramètres associé à cette courbe est la pression de demi-saturation (P_{50}) qui est la pression partielle de l'oxygène à laquelle il faut soumettre la solution d'hémoglobine pour qu'elle absorbe une masse d'oxygène équivalant à 50 % de la quantité maximum à laquelle elle est capable de se combiner. Or dans le cas de l'hémoglobine modifiée (hémoglobine couplée à des polymères) comme indiqué ci-dessus, la courbe de la figure 1 représentant le pourcentage de l'oxygène combiné à l'hémoglobine sous des pressions partielles d'oxygène déterminées, subit une translation vers la gauche par rapport à la courbe correspondant à l'hémoglobine native.

Ceci signifie que la pression P_{50} de l'hémoglobine modifiée est inférieure à celle de l'hémoglobine native; en d'autres termes l'hémoglobine modifiée présente une affinité trop forte vis à vis de l'oxygène, ce qui a pour inconvénient que l'oxygène ne peut être restituée rapidement aux tissus irrigués.

Cette modification des propriétés oxyphoriques de l'hémoglobine modifiée peut s'expliquer notamment pour les raisons suivantes :

- l'hémoglobine native subit à l'intérieur du globule rouge, l'influence du diphospho-2,3-glycérate (2,3 DPG) qui est l'effecteur naturel intraérythrocytaire, qui s'associe avec les amines du site allostérique de la déoxyhémoglobine, ce qui abaisse l'affinité de l'hémoglobine vis à vis de l'oxygène.

Des améliorations pour remédier à cet inconvénient ont été proposées en effectuant le couplage entre des polymères et de l'hémoglobine, en présence d'effecteurs temporaires (ou ligands) tels que le diphospho-2,3-glycérate ou l'inositol hexaphosphate et en absence totale d'oxygène (brevet français n° 83.145.45).

Ces substances polyphosphatées complexent fortement le site allostérique de la déoxyhémoglobine, stabilisant cette dernière, et protègent de cette façon les sites aminés qui sont essentiels pour le processus de transport de l'oxygène.

Cependant ces effecteurs sont éliminés soit au cours des étapes de purification des conjugués polymères de l'hémoglobine, soit dans le plasma, dans le cas où la purification n'a pas entraîné l'élimination des effecteurs, en raison des conditions dissociatives du plasma.

Pour remédier à cet inconvénient, on a proposé d'avoir recours à des effecteurs permanents, par exemple en fixant du pyridoxal-5'-phosphate (Japan Kokai Tokkyo JP n° 59.104.323).

On a également proposé d'utiliser des ligands avec plusieurs groupes phosphates qui, après fixation sur l'hémoglobine, diminuent sensiblement son affinité pour l'oxygène.

Cependant, l'un des inconvénients présentés par ces composés est que leur obtention met en oeuvre plusieurs opérations sur l'hémoglobine et en tout cas plus de deux, ce qui provoque la formation de produits de dégradation, notamment de méthémoglobine.

On a également proposé, dans la demande de brevet France n° 86.09625, des conjugués macromoléculaires

laire d'hémoglobine, dont la taille est telle que leur diffusivité extravasculaire est limitée, voire annulée, qui sont protégés contre les conditions dissociatives du plasma, dont les propriétés oxyphoriques ne sont pas altérées, mais améliorées par rapport à celles de l'hémoglobine libre, et dont la préparation limite le nombre d'étapes réactionnelles sur l'hémoglobine.

Or, ces composés sont présentés comme étant obtenus par un procédé en deux étapes, à savoir fixation de sites Z portant des charges anioniques sur le polymère P, suivi de la réaction entre le polymère P sur lequel ont été fixés les sites Z et l'hémoglobine, sous forme déoxygénée, en l'absence d'oxygène.

Ce procédé, toutefois simplifié par rapport aux procédés existant, peut être difficile à mettre en oeuvre à l'échelle industrielle, surtout dans le cas où l'on met en oeuvre des volumes importants de solutions de déoxyhémoglobine, la difficulté étant par ailleurs accrue dans la mesure où il est nécessaire de travailler en l'absence d'oxygène.

Or, la Société Demanderesse a trouvé de façon tout à fait inattendue un nouveau procédé d'une part permettant de préparer certains des conjugués qui font l'objet de la demande France n° 86.09625 et d'autre part permettant d'étendre l'accès de l'homme de l'art à de nouveaux conjugués qui présentent de bonnes propriétés oxyphoriques les rendant aptes à une utilisation in vivo comme substitut du sang.

Il s'est en effet avéré que certains conjugués de couplage de l'hémoglobine pouvaient être obtenus en mettant en oeuvre de l'hémoglobine sous forme oxygénée, et en travaillant dans des conditions n'impliquant pas l'absence d'oxygène.

Or, la possibilité de préparer des conjugués macromoléculaires d'hémoglobine en utilisant de l'hémoglobine sous forme oxygénée est toute à fait surprenante et va à l'encontre tant des données connues sur la conformation de l'hémoglobine que des résultats obtenus à ce jour.

En effet, compte tenu des données connues de la conformation de l'hémoglobine et notamment le fait que sous forme déoxy, certaines des amines de l'hémoglobine participent au verrouillage de l'hémoglobine en établissant des ponts salins définis ci-après, ces amines de l'hémoglobine engagées dans les ponts salins ne peuvent donc pas réagir facilement avec le polymère. Lorsque la déoxyhémoglobine et le polymère sont couplés dans le conjugué macromoléculaire d'hémoglobine obtenu, ces amines peuvent alors continuer à assurer la transition de conformation oxy = déoxy de l'hémoglobine. De plus, la déoxyhémoglobine possède un site (site allostérique β) tapissé de fonctions amines capables de s'associer énergiquement avec des structures renfermant des groupes anioniques. Les polymères portant des charges anioniques vont donc réagir préférentiellement à ce niveau et s'ils portent des fonctions réactives telles que carboxyle, aldéhyde ou OH, réagir à l'intérieur de ce site pour donner des conjugués où l'hémoglobine déoxy est stabilisée, par contre, quand l'hémoglobine est sous forme oxygénée, les ponts salins n'existent plus, et les amines correspondantes peuvent donc réagir avec le polymère, quel qu'il soit. Le résultat de ce couplage conduit à des conjugués dans lesquels l'hémoglobine se désoxygène difficilement, les amines modifiées par le polymère ne pouvant plus établir les ponts salins stabilisant la forme déoxy de l'hémoglobine. Par ailleurs, le site β est très désorganisé et l'effet d'orientation par les groupes anioniques du polymère ne peut plus jouer. On obtient ainsi des conjugués possédant une P_{50} très basse.

Ces hypothèses ont été confirmées par les résultats obtenus avec des polymères comportant - des sites Z comportant des charges anioniques constituées par des phosphates et/ou des sulfates, et/ou des carboxylates et

- des groupes carboxyliques, aldéhyde ou OH non situés sur les susdits sites Z, et dans lesquels la liaison ionique est établie entre le phosphate et/ou le sulfate, et/ou le carboxylate des sites Z du polymère et l'hémoglobine et la liaison covalente est établie entre les groupes carboxyliques, aldéhyde ou OH situés sur le polymère, et l'hémoglobine.

En effet, lorsque de tels polymères sont mis à réagir avec l'hémoglobine sous forme oxygénée, la P_{50} du conjugué macromoléculaire d'hémoglobine devient inférieure à celle de l'hémoglobine native.

Des résultats obtenus avec des polymères comportant des groupes carboxyliques, lesquels - d'une part, sous forme carboxylate, servent de charges anioniques établissant des liaisons ioniques entre le polymère et l'hémoglobine

- et, d'autre part, entrent dans l'établissement des liaisons covalentes entre le polymère et l'hémoglobine mais dans lesquels les groupes carboxyliques qui sont engagés dans les liaisons covalentes ne sont pas situés sur les sites Z qui portent les carboxylates qui établissent les liaisons ioniques, ont prouvé que les conjugués d'hémoglobine préparés à partir d'hémoglobine sous forme oxygénée présentent une P_{50} inférieure à celle de l'hémoglobine libre ; en d'autres termes, de tels conjugués d'hémoglobine n'ont pas de propriétés oxyphoriques intéressantes (cf. Preparative Biochemistry 14(4), 313-329 (1984)).

Or, la possibilité de préparer des conjugués d'hémoglobine présentant des propriétés oxyphoriques intéressantes à partir d'hémoglobine oxygénée a été obtenue grâce au procédé de l'invention.

On a par ailleurs déjà proposé des conjugués macromoléculaires d'hémoglobine dans lesquels - la liaison ionique entre le polymère et l'hémoglobine est établie entre des sites Z du polymère portant des charges anioniques et l'hémoglobine et - la liaison covalente est établie

. soit entre des sites Z du polymère et l'hémoglobine, . soit entre le polymère et l'hémoglobine, sous réserve de conditions entre la nature de la charge anionique, le nombre de charges anioniques et le nombre de monomères.

Or, on a constaté de façon inattendue qu'il suffisait d'au moins une charge anionique par polymère, sous

réserve que la charge anionique et la fonction susceptible de former la liaison covalente entre la polymère et l'hémoglobine soit située sur le même site Z.

L'un des buts de l'invention est de fournir un nouveau procédé permettant d'obtenir facilement des conjugués macromoléculaires physiologiquement compatibles, et susceptibles de fixer l'oxygène réversiblement.

L'un des buts de l'invention est de fournir un nouveau procédé permettant d'obtenir facilement des conjugués macromoléculaires susceptibles de restituer l'oxygène plus facilement que l'hémoglobine libre.

L'un des buts de l'invention est de proposer un nouveau procédé permettant d'obtenir des conjugués macromoléculaires faciles à synthétiser à l'échelle industrielle.

L'un des autres buts de l'invention est de fournir un nouveau procédé permettant d'obtenir des conjugués macromoléculaires d'hémoglobine, en soumettant l'hémoglobine au plus à deux étapes, et généralement à une seule étape.

L'un des autres buts de l'invention est de proposer un nouveau procédé permettant d'obtenir facilement des volumes importants de solutions aqueuses contenant des conjugués macromoléculaires d'hémoglobine susceptibles d'être utilisés comme substitut du sang, notamment dans les interventions nécessitant des transfusions ou la perfusion d'organe.

L'un des autres buts de l'invention est de fournir un nouveau procédé permettant d'obtenir facilement des solutions d'hémoglobine dont les propriétés oxyphoriques, révélées par une augmentation de la P_{50} *in vitro* par rapport à l'hémoglobine libre, demeurent stables *in vivo*.

L'un des autres buts de l'invention est de proposer un nouveau procédé permettant d'obtenir facilement des composés macromoléculaires d'hémoglobine présentant à la fois une affinité modérée par rapport à l'oxygène, ainsi qu'un volume hydrodynamique élevé, entraînant au cours d'expériences transfusionnelles, l'augmentation de la persistance intravasculaire de l'hémoglobine par suppression de l'hémoglobinurie.

L'un des autres buts de l'invention est de proposer un nouveau procédé permettant d'obtenir facilement des conjugués macromoléculaires d'hémoglobine qui présentent d'excellentes propriétés oxyphoriques révélées par une augmentation de la P_{50} *in vitro* par rapport à l'hémoglobine libre, dans lesquels le polymère utilisé, mis en présence d'hémoglobine mais dans des conditions de non couplage avec l'hémoglobine, n'entraîne pas nécessairement d'augmentation de la P_{50} par rapport à l'hémoglobine libre.

L'un des buts de l'invention est de proposer de nouveaux conjugués macromoléculaires présentant d'excellentes propriétés oxyphoriques révélées par une augmentation de la P_{50} *in vitro* et dont la P_{50} puisse être ajustée corrélativement au nombre de liaisons ioniques établies entre le polymère et l'hémoglobine.

Le procédé de préparation de conjugués macromoléculaires hydrosolubles d'hémoglobine, non biodégradables ou peu biodégradables, pendant le temps durant lequel le conjugué macromoléculaire doit assurer des fonctions oxyphoriques dans le plasma, présentant pour l'oxygène une affinité inférieure à celle de l'hémoglobine libre, caractérisé en ce que :

- on fixe, dans une première étape, des sites Z sur un polymère P, à raison d'au moins un site Z par chaîne de polymère, le polymère P étant hydrosoluble, non toxique, de préférence non antigénique, hémocompatible, de masse moléculaire d'environ 1 000 à environ 500 000, de préférence d'environ 1 000 à environ 100 000, comportant un ou plusieurs groupes polaires, de préférence des groupes hydroxyles, carboxyliques ou amines, et les sites Z contenant d'une part au moins une charge négative portée par des groupes, sulfates et/ou phosphates et/ou carboxylates, et destinée à créer une liaison ionique avec l'hémoglobine, et contenant d'autre part au moins un groupe carboxylique, aldéhyde ou OH, destiné à créer une liaison covalente avec l'hémoglobine,

. soit en utilisant un composé Z-Y dans lequel Y est une fonction active ou activable à l'aide d'un agent d'activation, telle que aldéhyde, carboxylique, amine, hydroxyle ou halogène, ou bien

. soit en effectuant un greffage radicalaire des sites Z sur le polymère P ;

- puis dans une seconde étape, on fait réagir le polymère P comportant le ou les sites Z avec de l'hémoglobine sous forme oxygénée, dans un milieu non déoxygéné, dans des conditions telles que l'hémoglobine ne subisse pas de dénaturation et puisse passer après couplage avec le polymère de façon réversible de la forme oxygénée à la forme déoxygénée, en milieu aqueux de pH compris d'environ 5 à environ 9,

pour former d'une part au moins une liaison ionique entre l'un au moins des sites Z portés par le polymère et l'hémoglobine et d'autre part au moins une liaison covalente entre le même susdit site Z porté par le polymère et l'hémoglobine,

- lorsque la réaction ci-dessus indiquée conduit éventuellement à des fonctions imines, celles-ci peuvent être stabilisées en fonctions amines, par exemple par réduction à l'aide de NaBH_4 , NaCNBH_3 , le diméthylaminoborane ou HCOOH .

Par commodité de langage, dans la suite du texte, et sauf indication contraire, l'expression "site Z" correspond au site Z après fixation sur le polymère.

Dans ce qui précède et ce qui suit, on utilise l'adjectif "carboxylate" pour désigner la charge anionique - provenant d'un groupe carboxylique - qui intervient dans la liaison ionique entre le polymère et l'hémoglobine et l'adjectif "carboxylique" pour désigner la fonction - provenant également d'un groupe carboxylique, mais différent du précédent - qui établit la liaison covalente entre le polymère et l'hémoglobine.

L'adjectif "carboxylique" englobe également l'anhydride formé à partir de deux groupes carboxyliques.

De plus la charge anionique provenant d'un carboxylate peut également provenir d'une fonction anhydride.

On a constaté qu'il était possible d'utiliser de l'hémoglobine sous forme oxygénée, dans des conditions

n'impliquant pas l'absence d'oxygène. Plus précisément, on a constaté :

- que par exemple il est inutile de déoxygéner en boîte à gants et de mettre sous vide les solutions utilisées pour dissoudre le polymère, lorsque celui-ci a été lyophilisé après qu'on y a fixé les sites Z ;
- qu'il est également inutile après déoxygénation des susdites solutions d'effectuer un balayage à l'azote,
- et qu'il est également inutile de traiter l'hémoglobine par les étapes indiquées ci-dessus, à savoir déoxygénation de l'hémoglobine en boîte à gants, mise sous vide et balayage à l'azote et inutile d'avoir à opérer ultérieurement en l'absence d'oxygène, afin d'effectuer le couplage entre le polymère et l'hémoglobine.

5

On a constaté également que ce procédé n'est applicable que dans la mesure où le site Z porte simultanément :

- des groupes anioniques, choisis parmi les sulfates, phosphates, carboxylates et
- des groupes carboxyliques, aldéhyde ou OH.

10

En d'autres termes, ce procédé n'est applicable que si une liaison ionique et une liaison covalente sont établies entre le polymère et l'hémoglobine, par l'intermédiaire d'au moins un même site Z porteur des groupes appropriés.

Le procédé de l'invention ne s'applique donc que dans la mesure où :

15

- il y a établissement d'une liaison ionique entre un groupe phosphate, sulfate ou carboxylate, situé sur un site Z porté par le polymère, et l'hémoglobine,
- et le susdit site Z comporte également un groupe aldéhyde, carboxylique ou OH qui forme une liaison covalente entre le polymère et l'hémoglobine.

En d'autres termes, le procédé de l'invention ne s'applique pas aux polymères comportant d'une part des sites Z, porteurs d'un groupe anionique choisi parmi le sulfate, phosphate, carboxylate

20

et d'autre part des groupes carboxyliques, aldéhyde ou OH, non situés sur les susdits sites Z.

En d'autres termes, le site Z avant fixation sur le polymère comporte au moins trois groupes fonctionnels qui sont tels que :

- l'une des fonctions est une fonction permettant d'attacher le groupe Z sur le polymère,
- l'une des fonctions est une fonction sulfate, phosphate ou carboxylate susceptible d'établir une liaison ionique avec une amine du site allostérique de l'hémoglobine,
- l'une des fonctions est une fonction aldéhyde, carboxylique ou OH, susceptible de former une liaison covalente avec un groupe NH₂ de l'hémoglobine.

25

Par agent d'activation utilisé pour activer la fonction Y du composé Z-Y dont il est question ci-dessus, on désigne par exemple ceux choisis dans le groupe constitué par les carbodiimides ou le carbonyldiimidazole.

30

Lorsque le site Z est fixé par greffage radicalaire sur le polymère est utilisé un initiateur radicalaire tel que par exemple le nitrate ou le sulfate cérique d'ammonium ou tout autre agent capable de créer des radicaux libres sur la chaîne polymère (azobis isobutyronitrile, peroxydes, etc...).

Selon un mode de réalisation avantageux du procédé de l'invention, tous les sites Z qui interviennent dans les liaisons covalentes entre le polymère et l'hémoglobine sont les mêmes que les sites Z qui interviennent dans les liaisons ioniques entre le polymère et l'hémoglobine.

35

Dans le procédé selon l'invention, si les groupes polaires du polymère sont ionisables et s'ils ne sont pas tous engagés dans des liaisons avec les sites Z, ces groupes polaires sont de préférence bloqués afin d'éviter des interactions ultérieures avec les protéines plasmatiques *in vivo*.

40

C'est ainsi lorsque les groupes polaires sont des amines, celles qui ne sont pas engagées dans des liaisons avec les sites Z peuvent être bloquées par exemple à l'aide d'anhydride acétique.

Lorsque les groupes polaires sont des carboxyliques, ceux-ci peuvent être bloqués par exemple à l'aide d'éthanolamine.

Le procédé de l'invention est avantageusement effectué dans des conditions telles que les groupes polaires du polymère sont tous engagés dans les liaisons avec les sites Z, ce qui a pour conséquence qu'il n'y a plus de blocage à effectuer sur les groupes polaires.

45

Ces conditions consistent notamment à réguler la quantité de sites Z fixés sur le polymère, en fonction des groupes polaires du polymère.

Lorsque les groupes polaires ne sont pas préexistants sur le polymère mis en oeuvre mais doivent être fixés sur le polymère, on peut également contrôler la quantité de groupes polaires qu'on fixe, de façon à ce que le nombre de sites Z fixés sur le polymère soit celui souhaité, sans qu'il y ait pour autant de groupes polaires (résiduels) à bloquer après fixation des sites Z.

50

Le contrôle du nombre de sites Z peut être très intéressant dans la mesure où il intervient dans la variation de P₅₀, par l'intermédiaire de la densité de la charge négative provenant du site Z.

55

Le contrôle de la fixation des groupes polaires sur le polymère peut se faire de la façon suivante :

Dans l'exemple du dextrane aminé, le nombre de groupes amines peut être modulé en contrôlant la réaction qui précède et qui consiste à faire réagir de l'épichlorhydrine sur le dextrane en présence de catalyseur.

Ce contrôle peut être fait en faisant varier le temps de réaction ou en faisant varier la quantité de catalyseur.

Le contrôle de la fixation des sites Z sur les groupes polaires du polymère lorsque les groupes polaires sont préexistants ou déjà fixés sur le polymère peut se faire de la façon suivante :

60

- soit en faisant varier le rapport molaire entre les composés Z-Y définis ci-dessus et les groupes polaires du polymère,

- soit en faisant varier le rapport molaire entre l'agent d'activation défini ci-dessus et les groupes polaires du polymère.

65

Lorsque les groupes Z sont greffés par voie radicalaire, le contrôle de leur fixation se fait indépendamment des groupes polaires, en modulant la quantité d'initiateur radicalaire utilisée au cours de la réaction de greffage.

5 En ce qui concerne la charge anionique, on a constaté qu'il suffisait d'au moins une charge anionique (que ce soit sulfate, phosphate ou carboxylate), par site Z, et qu'il suffisait d'au moins un tel site Z par polymère.

En d'autres termes, on a constaté que le procédé de l'invention était applicable à la préparation de conjugués comportant au moins un seul groupe anionique, et notamment un seul groupe anionique par polymère (lequel groupe anionique n'intervient pas dans le couplage covalent entre le polymère et l'hémoglobine), pour former entre le polymère et l'hémoglobine une liaison ionique.

10 On a constaté qu'une condition nécessaire pour que les conjugués macromoléculaires obtenus par le procédé de l'invention soient hydrosolubles, dénués de toxicité, de préférence non antigéniques, et hémocompatibles est que les polymères P, susceptibles d'entrer dans la constitution des susdits conjugués macromoléculaires soient hydrosolubles, dénués de toxicité, de préférence non antigéniques, et hémocompatibles.

15 On a constaté que la présence sur la chaîne du polymère de sites Z, porteurs de groupes anioniques qui jouent le rôle d'effecteurs permanents, augmente la pression partielle pour laquelle 50 % de l'hémoglobine en solution est oxygénée, sans que cela puisse être imputé à l'existence éventuelle de ligands libres.

20 Ces effecteurs permanents tels qu'ils permettent également à l'hémoglobine de passer réversiblement de la forme désoxygénée à la forme oxygénée, avec une stabilisation plus forte de la conformation de la molécule d'hémoglobine sous forme désoxygénée, ce qui entraîne une diminution de l'affinité de l'hémoglobine vis à vis de l'oxygène.

En d'autres termes, ces effecteurs permettent à l'hémoglobine de transporter réversiblement l'oxygène, et notamment de relarguer facilement l'oxygène dans les tissus qui sont irrigués.

25 La liaison covalente est telle qu'elle confère au conjugué macromoléculaire obtenu par le procédé de l'invention une stabilité le rendant non biodégradable ou peu biodégradable en milieu plasmatique, pendant le temps durant lequel le conjugué macromoléculaire doit assurer des fonctions oxyphoriques, c'est-à-dire 2 à 3 jours, ce qui supprime la diffusion extrarénale et extravasculaire de l'hémoglobine.

30 Dans les conjugués macromoléculaires obtenus par le procédé de l'invention, l'hémoglobine est reliée au polymère par au moins une liaison covalente mais au-delà d'un nombre critique de liaisons covalentes entre les polymères et l'hémoglobine, notamment quand il y a phénomène de réticulation intermoléculaire, ceci nuit aux propriétés de l'hémoglobine.

Ce nombre critique de liaisons covalentes correspond au fait que la masse moléculaire moyenne en poids des conjugués macromoléculaires de l'invention ne doit pas être supérieure à environ 1 000 000.

35 Les polymères qui entrent dans la constitution des conjugués macromoléculaires obtenus par le procédé de l'invention qui sont dégradés dans le milieu plasmatique ont une masse moléculaire moyenne en poids d'environ 1 000 à 500 000.

40 Les polymères qui entrent dans la constitution des conjugués macromoléculaires obtenus par le procédé de l'invention et qui ne sont pas dégradés dans l'organisme doivent avoir une masse moléculaire moyenne en poids égale ou inférieure à environ 10 000, car au-delà de cette valeur les polymères passent difficilement la barrière rénale et s'accumulent donc dans l'organisme.

C'est notamment le cas des polyalkylène glycols, de la polyvinylpyrrolidone, du polyméthacrylate ou de certains polysaccharides, qui n'étant pas biodégradables doivent présenter une masse moléculaire moyenne en poids égale ou inférieure à environ 10 000.

45 Les polymères qui entrent dans la constitution des conjugués macromoléculaires obtenus par le procédé de l'invention doivent être utilisés dans une gamme de poids moléculaire dans laquelle ils sont de préférence non antigéniques.

C'est ainsi que dans le cas du dextrane, son poids moléculaire doit être inférieur à environ 70 000.

La première étape de préparation des conjugués macromoléculaires de l'invention et qui consiste à fixer des sites Z sur le polymère, peut être effectuée par des méthodes connues.

50 La première étape de préparation des conjugués macromoléculaires de l'invention peut également être effectuée en utilisant des composés du type Z-Y dans lesquels Y est une fonction aldéhyde, carboxylique, amine, hydroxyle ou halogène. Ces composés Z-Y peuvent être utilisés en ayant recours à des techniques chimiques classiques ; on peut par exemple fixer de l'acide benzène penta- ou hexacarboxylique, de l'acide diphosphoro-2,3 glycérique, du pyridoxal-5'-phosphate sur un polymère préalablement polyaminé.

55 Dans ce cas, il est impératif d'éliminer toute trace du composé Z-Y, par exemple par dessalage sur une colonne de filtration sur gel. En effet, il faut éviter la présence de composé Z-Y qui n'aurait pas réagi et qui, même en faible concentration avec les conjugués macromoléculaires de l'invention peut fausser les conclusions relatives aux propriétés des conjugués de l'invention.

60 On peut également avoir recours à toute autre méthode permettant de fixer des chaînes polyanioniques sur un polymère, tel qu'une méthode de greffage radicalaire.

La seconde étape mentionnée ci-dessus est une étape de réaction entre le polymère et l'hémoglobine et peut, si nécessaire, être éventuellement précédée d'une phase d'activation du polymère avant que le polymère ne soit mis à réagir avec l'hémoglobine; mais cette activation peut être pratiquement simultanée avec la réaction entre le polymère et l'hémoglobine.

65 Au cours de la seconde étape, le polymère réagit avec l'hémoglobine et d'une part les liaisons ioniques

entre les sites Z du polymère et l'hémoglobine et d'autre part les liaisons covalentes entre le polymère et l'hémoglobine se forment.

Dans le cas où ce sont des groupes carboxyliques des sites Z qui interviennent dans la liaison covalente avec des groupes NH₂ de l'hémoglobine, on peut utiliser pour activer les groupes carboxyliques les réactifs classiquement utilisés dans la synthèse peptidique, tels que les carbodiimides hydrosolubles, notamment le chlorhydrate de N'-éthyl-N-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDCI), la N-hydroxysuccinimide, ou l'éthoxy-2-quinoline-1-carboxylate d'éthyle (EEDQ).

La liaison obtenue est alors une liaison amide.

Dans le cas où ce sont les groupes aldéhyde des sites Z qui interviennent dans la liaison covalente avec des groupes NH₂ de l'hémoglobine, on peut par exemple avoir recours à l'amination réductive.

L'amination réductive d'un aldéhyde consiste à former une imine par l'action d'une amine, et à réduire simultanément l'imine en amine à l'aide d'un réducteur tel que NaBH₄, NaCNBH₃, le diméthylaminoborane ou HCOOH.

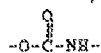
La liaison obtenue est alors une liaison amine.

Dans le cas où ce sont des groupes aldéhydes des sites Z qui interviennent dans la liaison covalente avec des groupes NH₂ de l'hémoglobine, on peut également opérer dans des conditions telles que la liaison obtenue soit une liaison imine, laquelle peut ensuite être stabilisée en amine par réduction avec un réducteur doux, tel que l'un de ceux mentionnés ci-dessus.

Lorsque les groupes Z, ne comportent ni groupes aldéhydes, ni de groupes carboxyliques, mais qu'ils renferment des groupes hydroxyles dont certains sont sur des carbones adjacents, on peut former des groupes aldéhydes, par exemple par oxydation périodique, notamment à l'aide de NaIO₄.

La liaison obtenue entre ces groupes aldéhydes et les amines de l'hémoglobine est alors une liaison imine, laquelle peut être stabilisée en amine par réduction, par exemple avec NaBH₄.

Lorsque les sites Z ne comportent ni groupes aldéhydes ni groupes carboxyliques, mais comportent une ou plusieurs fonctions OH, les sites Z peuvent être mis en jeu sur des groupes NH₂ de l'hémoglobine à l'aide d'un réactif approprié tel que le carbonyldimidazole. Dans ce cas, la liaison obtenue est une liaison carbamate



Les conjugués macromoléculaires d'hémoglobine dans lesquels les liaisons covalentes entre le polymère sont des liaisons imines peuvent ne pas être stables dans l'organisme, c'est pourquoi il convient de stabiliser la fonction imine en amine, par exemple par réduction par NaBH₄, NaCNBH₃, ou le diméthylaminoborane.

Dans le cas où il est nécessaire de stabiliser les liaisons covalentes, l'hémoglobine n'est en tout cas pas soumise à plus de deux étapes de réaction, et dans les autres cas, qu'il y ait activation ou non du polymère P, l'hémoglobine est soumise à une seule étape de réaction, ce qui est particulièrement avantageux car le nombre limité d'étapes de réaction sur l'hémoglobine (au plus égal à deux) est l'une des conditions essentielles pour que, en plus du rendement de la réaction, l'hémoglobine ne soit pas dénaturée.

Au cours de la deuxième étape, il est en effet essentiel que l'hémoglobine ne subisse au cours de la formation du conjugué macromoléculaire de l'invention ni dénaturation importante, ni réduction sensible de la mobilité relative des diverses entités qui la constituent afin de conserver, au moins en partie, ses propriétés oxyphoriques.

La deuxième étape de réaction a lieu en milieu aqueux, tamponné ou non, à un pH d'environ 5 à environ 9, éventuellement en présence d'un activateur comme indiqué ci-dessus, pendant une durée suffisante et de préférence inférieure à celle à partir de laquelle il y a formation importante de méthémoglobine (supérieure à environ 5%), à une température assurant une conservation correcte de l'hémoglobine.

Le milieu aqueux est tamponné par des tampons classiquement utilisés, pour stabiliser le pH à la valeur souhaitée.

La durée de réaction est d'environ 30 mn à environ 20 h, et avantageusement d'environ 1 h à environ 8 h, à une température d'environ 3 à environ 30°C.

La durée de la réaction dépend notamment de la température à laquelle on travaille.

L'hémoglobine utilisée est sous forme oxygénée, et on utilise avantageusement une solution d'hémoglobine à 10%.

Le rapport des concentrations molaires entre le polymère et l'hémoglobine doit en outre être tel que la plus grande partie des molécules d'hémoglobine soit liée de façon covalente avec le polymère polyanionique.

A titre d'exemple, on peut indiquer qu'en faisant réagir, à une température d'environ 3 à 30°C, en solution dans un milieu aqueux à pH voisin de 6,5, un mélange de polymère dextrane, dont la masse moléculaire moyenne en poids est d'environ 10 000 à environ 40 000, et d'hémoglobine dans lequel le rapport des concentrations molaires entre le dextrane et l'hémoglobine est d'environ 0,5 à environ 5, on obtient des conjugués macromoléculaires de l'invention, dont l'examen chromatographique, par exemple par perméation sur gel montre qu'il n'y a plus d'hémoglobine libre.

Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé de l'invention est tel qu'aucune liaison ionique et aucune liaison covalente n'est susceptible de s'établir ailleurs qu'entre les groupes respectifs appropriés des sites Z du polymère et l'hémoglobine.

Un procédé de préparation de conjugués macromoléculaires avantageux de l'invention est caractérisé en ce que l'on fixe les sites Z sur le polymère P de telle sorte que la relation entre le nombre et la nature des charges négatives destinés à créer une liaison ionique entre un site et l'hémoglobine (non engagées dans la

liaison entre un site et le polymère et non engagées dans la liaison covalente entre un site et l'hémoglobine) soit la suivante :

- lorsque chaque site Z contient un groupe anionique unique constitué d'un sulfate ou d'un phosphate, il y a au moins un tel site Z tous les dix monomères du polymère,
- 5 - lorsqu'il s'agit de site Z contenant au moins deux groupes anioniques, constitués de sulfates et/ou de phosphates, il y a au moins un tel site Z par chaîne de polymère,
- lorsque chaque site Z contient des charges anioniques provenant de carboxylates, il faut au moins deux groupes carboxylates - non engagés dans la liaison covalente entre le polymère et l'hémoglobine - sur un même site Z, et au moins un tel site Z tous les cinq monomères,
- 10 - lorsqu'il s'agit de site Z contenant au moins trois charges négatives provenant de carboxylates - non engagés dans la liaison covalente entre le polymère et l'hémoglobine - il y a au moins un tel site Z par chaîne de polymère.

La relation entre le nombre de sites Z et de monomères est statistique dans la mesure où par exemple, lorsque il est indiqué qu'il y a au moins un site Z par chaîne de polymère, cela signifie que certaines chaînes de polymère ne peuvent comporter aucun site Z et certaines autres chaînes peuvent comporter deux sites, mais il est bien évident que, pour être active vis-à-vis de l'hémoglobine, une chaîne de polymère doit contenir au moins un site Z.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, le procédé de l'invention de préparation de conjugués macromoléculaires est caractérisé en ce que l'on fixe les sites Z sur le polymère P de telle sorte que la relation entre le nombre et la nature des charges négatives destinés à créer une liaison ionique entre un site et l'hémoglobine (non engagées dans la liaison entre un site et le polymère et non engagées dans la liaison covalente entre un site et le polymère) soit la suivante:

- lorsqu'il s'agit de site Z contenant un groupe anionique unique constitué d'un sulfate ou d'un phosphate, il y a au moins un tel site Z par chaîne de polymère et au plus un site Z tous les onze monomères,
- 25 - lorsqu'il s'agit de site Z contenant un groupe anionique unique constitué d'un carboxylate - non engagé dans la liaison entre le site et le polymère et non engagé dans la liaison covalente entre le polymère et l'hémoglobine - il y a au moins un tel site Z par chaîne de polymère,
- lorsqu'il s'agit de site Z contenant deux charges anioniques provenant de deux carboxylates - non engagés dans la liaison entre le site et le polymère et non engagés dans la liaison covalente entre le polymère et l'hémoglobine -, il y a au moins un tel site Z par chaîne de polymère et au plus un tel site Z tous les six monomères.

Les conjugués d'hémoglobine obtenus par mise en oeuvre selon cette variante du procédé de l'invention sont nouveaux.

Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que les liaisons covalentes entre le polymère P et l'hémoglobine sont établies entre au moins un groupe carboxylique ou aldéhyde ou OH porté par les sites Z et au moins une amine de l'hémoglobine située dans le site allostérique de l'hémoglobine, notamment l'amine de l'une au moins des deux valines β -terminales de l'hémoglobine.

Selon un mode de réalisation avantageux du procédé de l'invention, les ponts salins entre les groupes NH_3^+ et les groupes COO^- internes de l'hémoglobine sont intacts lorsque l'hémoglobine est sous forme déoxygénée.

On désigne par ponts salins, certaines liaisons intra-moléculaires qui se forment entre des ions NH_3^+ et des anions COO^- , lorsque l'hémoglobine est sous forme déoxygénée.

Les ponts salins dans les conjugués macromoléculaires obtenus par le procédé de l'invention doivent de préférence être intacts, car si les ions qui participent à la formation de ces ponts salins, sont engagés dans d'autres liaisons, le passage de l'hémoglobine de la forme oxygénée à la forme déoxygénée se fait très difficilement et de manière incomplète.

L'expression "ponts salins intacts" signifie qu'au moins 50 % des ponts salins ne sont pas altérés, et qu'avantageusement 80 à 90 %, voire 100 %, des ponts salins ne sont pas altérés.

Les critères permettant de vérifier si les ponts salins sont intacts sont notamment les suivants :

- a) Courbe d'affinité vis à vis de l'oxygène :
si la courbe d'affinité vis à vis de l'oxygène (courbe de Barcroft) est déplacée vers la droite par rapport à celle de l'hémoglobine libre, ceci implique que les ponts salins ne sont pas modifiés.
- 55 b) Coefficient de Hill (n) :
ce paramètre traduit l'allure sigmoïde de la courbe de Barcroft et reflète le caractère plus ou moins coopératif de la fixation de l'oxygène. La valeur de n permet d'apprécier la permanence du comportement allostérique de l'hémoglobine. Dans le cas de l'hémoglobine native, ce coefficient est compris entre 2,7 et 3,0.
- 60 c) Effet Bohr :
il consiste à déterminer le comportement oxyphorique de l'hémoglobine à différents pH, ce qui permet d'évaluer les perturbations consécutives aux différentes manipulations.

Selon un autre mode de réalisation avantageux les conjugués macromoléculaires de l'invention sont tels que les polymères sont choisis parmi les polysaccharides, notamment les hydroxyalkylamidons dont le groupe alkyle comporte de 2 à 4 atomes de carbone, l'inuline, le dextrane et ses dérivés, notamment le dextrane

aminé, l'alcool polyvinylique, la polyvinylpyrrolidone, le polyméthacrylate et ses dérivés, les polypeptides, les polyalkylène glycols dans lesquels le groupe alkylène comporte de 2 à 5 atomes de carbone, notamment le polyéthylène glycol et le polypropylène glycol.

Les conjugués d'hémoglobine obtenus selon le procédé de l'invention sont tels que les liaisons ioniques entre le polymère et l'hémoglobine sont établies entre les groupes phosphate, sulfate ou carboxylate des sites Z du polymère et les groupes amines de l'hémoglobine.

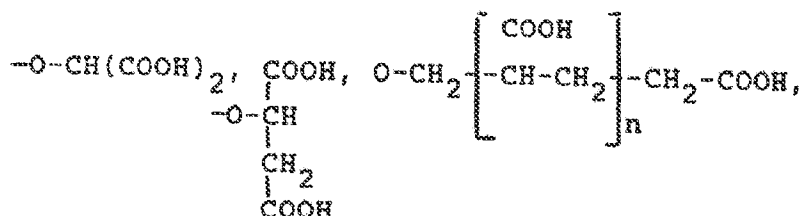
Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, les conjugués macromoléculaires sont tels que les liaisons ioniques sont établies entre les groupes carboxylates des sites Z du polymère et les groupes NH₂ de l'hémoglobine.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, les sites Z comportent OSO₃H ou OPO₃H₂.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, les sites Z proviennent du pyridoxaisulfate, du disulfate d'épinéphrine, du trisulfate d'épinéphrine, du disulfate de norépinéphrine, du trisulfate de norépinéphrine, du disulfate de phénolphtaléine.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, les sites Z proviennent du pyridoxal phosphate, de l'adénosine triphosphate, de la phosphotyrosine, de la phosphosérine, de l'inositolhexaphosphate et ses dérivés, de l'inositol tri-, tétra-, pentaphosphate et ses dérivés.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, les sites Z comportent les groupes suivants :

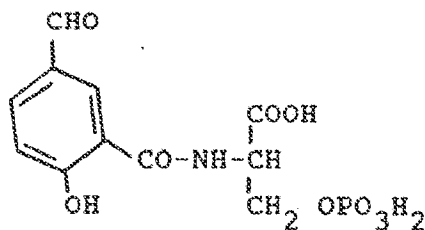


n variant 1 à 4.

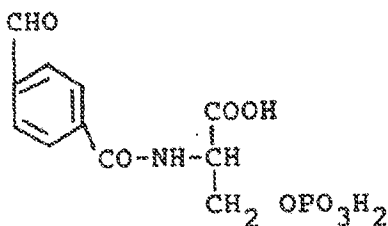
Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, le site Z provient :

- d'un acide carboxylique contenant au moins un groupe carboxylate sur la chaîne principale non engagé dans la liaison entre le polymère et le site Z et non engagé dans la liaison covalente entre le site Z et l'hémoglobine,
- d'un acide benzènescarboxylique comportant au moins une fonction carboxylique non engagée dans la liaison entre le polymère et le site Z et non engagé dans la liaison covalente entre le site Z et l'hémoglobine,
- d'un groupe diphospho 2,3-glycérate,
- de l'acide citrique,
- du propane 1, 2, 3 tricarboxylate
- ou du butane tétracarboxylate.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention Z provient de l'hydroxy-2-formyl-5-phosphosérine benzamide de formule :



ou du formyl-4-phosphosérine benzamide de formule :



La nature de la liaison qui relie Z au polymère dépend des éléments réactionnels en présence et des conditions de réaction.

Les liaisons qui unissent Z au polymère sont des liaisons éther, ester, amide ou amine.

La liaison éther est obtenue par greffage radicalaire de l'acide acrylique, ou par action d'acide chlorosuccinique, sur les groupes OH des polymères ; la liaison amide est obtenue par réaction entre les groupes carboxylates des groupes Z et les groupes NH₂ des polymères; la liaison amine est obtenue par réaction entre les groupes aldéhydes des groupes Z et les groupes NH₂ des polymères, suivie d'une réduction. Cette dernière réaction peut également être effectuée simultanément à la première amination réductive.

A titre d'exemple, la liaison ester est obtenue

. soit par action des groupes carboxyliques d'un site Z, sous forme anhydride, sur les fonctions OH d'un polymère,

. soit par action d'un groupe carboxylique d'un site Z sur les fonctions OH d'un polymère en présence d'agents de condensation tels que les carbodiimides.

Selon un mode de réalisation avantageux du procédé de préparation, les conjugués de l'invention dans lesquels les sites Z sont reliés au polymère par l'intermédiaire d'une liaison ester peuvent être obtenus de la façon suivante:

- dans une première étape, on fait réagir les sites Z dans lesquels les groupes carboxyliques sont sous forme anhydride, sur un polymère comportant des fonctions OH, dans un milieu dans lequel le polymère est soluble, pour fixer les sites Z sur le polymère;

- dans une seconde étape, on fait réagir le polymère P comportant le ou les sites Z avec de l'hémoglobine sous forme oxygénée, dans un milieu non déoxygéné, dans des conditions telles que l'hémoglobine ne subisse pas de dénaturation et puisse passer après couplage avec le polymère de façon réversible de la forme oxygénée à la forme déoxygénée, en milieu aqueux de pH compris d'environ 5 à environ 9,

pour former d'une part au moins une liaison ionique entre l'un au moins des sites Z portés par le polymère et l'hémoglobine et d'autre part au moins une liaison covalente entre le même susdit site Z porté par le polymère et l'hémoglobine.

Selon un autre mode de réalisation avantageux du procédé de préparation, les conjugués de l'invention dans lesquels les sites Z sont reliés au polymère par l'intermédiaire d'une liaison ester peuvent être obtenus de la façon suivante:

- dans une première étape, on fait réagir les sites Z comportant des groupes carboxyliques, sur un polymère comportant des fonctions OH, en présence d'un agent de condensation tel qu'une carbodiimide, pour fixer les sites Z sur le polymère;

- dans une seconde étape, on fait réagir le polymère P comportant le ou les sites Z avec de l'hémoglobine sous forme oxygénée, dans un milieu non déoxygéné, dans des conditions telles que l'hémoglobine ne subisse pas de dénaturation et puisse passer après couplage avec le polymère de façon réversible de la forme oxygénée à la forme déoxygénée, en milieu aqueux de pH compris d'environ 5 à environ 9,

pour former d'une part au moins une liaison ionique entre l'un au moins des sites Z portés par le polymère et l'hémoglobine et d'autre part au moins une liaison covalente entre le même susdit site Z porté par le polymère et l'hémoglobine.

Les carbodiimides utilisées dépendent du milieu dans lequel le polymère est soluble. Lorsque le polymère est du polyéthylène glycol, on peut utiliser une carbodiimide soluble dans l'eau ou dans un milieu organique. Lorsque le polymère est du dextrane, étant donné que le polymère est soluble uniquement dans l'eau, la carbodiimide utilisée est avantageusement le chlorhydrate de N'-éthyl-N(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDCI).

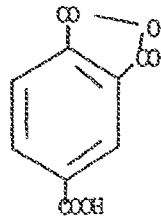
Comme exemple de polymères comportant des groupes OH on peut citer: le dextrane, le polyéthylène glycol.

Par "site Z dans lesquels les groupes carboxyliques sont sous forme anhydride", on entend aussi bien les sites Z comportant deux groupes carboxyliques sous forme anhydride (monoanhydrides) que ceux comportant un nombre pair de groupes carboxyliques dans lesquels chaque paire de groupes carboxyliques est sous forme anhydride (polyanhydrides: par exemple dianhydride ou trianhydride).

Comme exemple de sites Z dans lesquels les groupes carboxyliques sont sous forme anhydride on peut citer, outre les anhydrides d'acide polycarboxyliques, tels que le benzène 1,2,4,5 tétracarboxylique dianhydride, le benzène 1,2,4 tricarboxylique anhydride, également le cyclobutane 1,2,3,4 tétracarboxylique dianhydride, la benzophénone tétracarboxylique dianhydride, l'anhydride de l'acide aconitique.

Le procédé de l'invention met avantageusement en oeuvre, à titre de site Z, le dianhydride d'acide polycarboxylique dans lequel l'un des groupes carboxyliques de l'une des fonctions anhydrides est engagé dans la liaison covalente entre le polymère et l'hémoglobine, et les autres groupes carboxyliques (dont ceux provenant des fonctions anhydrides) servent à la liaison ionique et à la liaison covalente entre le site Z et l'hémoglobine.

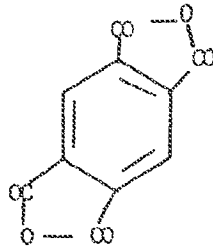
Le procédé de l'invention met avantageusement en oeuvre le composé de formule :



5

ou le composé de formule :

10



15

20

Lorsque le polymère est du dextrane, le milieu dans lequel est effectué la première étape, dont question ci-dessus, est de l'eau.

25

Dans le cas où le polymère est du polyéthylène glycol le milieu peut être de l'eau ou un milieu organique tel que le diméthylformamide.

Les liaisons covalentes entre le polymère et l'hémoglobine, sont établies entre les groupes NH_2 de l'hémoglobine et les groupes carboxyliques, aldéhyde ou OH, qui se trouvent sur les sites Z.

La liaison covalente entre le polymère et l'hémoglobine est une liaison amide, imine, amine ou carbamate.

30

Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, les liaisons covalentes sont établies entre des groupes carboxyliques des sites Z du polymère et des groupes NH_2 de l'hémoglobine.

Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé de l'invention concerne la préparation de conjugués d'hémoglobine à partir de dextrane aminé de masse moléculaire d'environ 40 000, et d'environ $2 \cdot 10^{-4}$ moles d'acide benzenhexacarboxylique par g de dextrane,

35

- les liaisons ioniques étant établies par l'intermédiaire des groupes carboxylates du benzenepentacarboxylate fixé sur le polymère, non engagés dans la liaison entre le polymère et l'acide benzenhexacarboxylique,

- et les liaisons covalentes étant établies entre les autres groupes carboxyliques de l'acide benzenepentacarboxylique - à la fois non engagés dans la liaison entre l'acide benzenhexacarboxylique et le polymère et non engagés dans les liaisons ioniques ci-dessus définies - et des groupes NH_2 de l'hémoglobine.

40

Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé de l'invention concerne la préparation de conjugués d'hémoglobine à partir de dextrane aminé, de masse moléculaire d'environ 10 000, et d'environ $3,5 \cdot 10^{-4}$ moles d'acide benzenhexacarboxylique par g de dextrane,

- les liaisons ioniques étant établies par l'intermédiaire des groupes carboxylates du benzenepentacarboxylate fixés sur le polymère, non engagés dans la liaison entre le polymère et l'acide benzenhexacarboxylique,

45

- et les liaisons covalentes étant établies entre les autres groupes carboxyliques de l'acide benzenepentacarboxylique - à la fois non engagés dans la liaison entre l'acide benzenhexacarboxylique et le polymère et non engagés dans les liaisons ioniques ci-dessus définies - et des groupes NH_2 de l'hémoglobine.

Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé de l'invention concerne la préparation de conjugués d'hémoglobine à partir de dextrane aminé, de masse moléculaire d'environ 10 000, et d'environ $3,2 \cdot 10^{-4}$ moles de benzenetetracarboxylique par g de dextrane,

50

- les liaisons ioniques étant établies par l'intermédiaire des groupes carboxylates du benzenetricarboxylate fixé sur le polymère, non engagés dans la liaison entre le polymère et l'acide benzenetetracarboxylique,

- et les liaisons covalentes étant établies entre les autres groupes carboxyliques de l'acide benzenetricarboxylique - à la fois non engagés dans la liaison entre l'acide benzenetetracarboxylique et le polymère et non engagés dans les liaisons ioniques ci-dessus définies - et des groupes NH_2 de l'hémoglobine.

55

Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé de l'invention concerne la préparation de conjugués d'hémoglobine à partir de dextrane aminé, de masse moléculaire d'environ 10 000, et d'environ $4 \cdot 10^{-4}$ moles de butane tetracarboxylique par g de polymère,

- les liaisons ioniques étant établies par l'intermédiaire des groupes carboxylates du butanetricarboxylate fixé sur le polymère, non engagés dans la liaison entre le polymère et l'acide butanetetracarboxylique

60

- et les liaisons covalentes étant établies entre les autres groupes carboxyliques de l'acide butanetricarboxylique - à la fois non engagés dans la liaison entre l'acide butanetetracarboxylique et le polymère et non engagés dans les liaisons ioniques ci-dessus définies - et des groupes NH_2 de l'hémoglobine.

Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé de l'invention concerne la préparation de conjugués

65

d'hémoglobine à partir de monométhoxypolyoxyéthylène mono aminé, de masse moléculaire d'environ 5 000, et d'environ $1,5 \times 10^{-4}$ moles de benzènehexacarboxylique par g de polymère,

- les liaisons ioniques étant établies par l'intermédiaire des groupes carboxylates du benzènepentacarboxylate fixé sur le polymère, non engagés dans la liaison entre le polymère et l'acide benzènehexacarboxylique
 5 - et les liaisons covalentes étant établies entre les autres groupes carboxyliques de l'acide benzènepentacarboxylique - à la fois non engagés dans la liaison entre l'acide benzènehexacarboxylique et le polymère et non engagés dans les liaisons ioniques ci-dessus définies - et des groupes NH_2 de l'hémoglobine.

Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé de l'invention concerne la préparation de conjugués d'hémoglobine à partir de dextrane, de masse moléculaire d'environ 10 000, et d'environ $6,3 \times 10^{-4}$ moles de benzène-1,2,4 tricarboxylique par g de polymère,

- les liaisons ioniques étant établies par l'intermédiaire du groupe carboxylate du benzenedicarboxylate fixé sur le polymère, non engagé dans la liaison entre le polymère et l'acide benzène-1,2,4 tricarboxylique
 - et les liaisons covalentes étant établies entre l'autre groupe carboxylique de l'acide benzenedicarboxylique - à la fois non engagé dans la liaison entre l'acide benzène-1,2,4 tricarboxylique et le polymère et non
 15 engagé dans les liaisons ioniques ci-dessus définies - et des groupes NH_2 de l'hémoglobine.

Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé de l'invention concerne la préparation de conjugués d'hémoglobine à partir de dextrane, de masse moléculaire d'environ 10 000, et d'environ $1,15 \times 10^{-3}$ moles de benzène-1,2,4,5 tétracarboxylique par g de polymère,

- les liaisons ioniques étant établies par l'intermédiaire des groupes carboxylates du benzenetricarboxylate fixé sur le polymère, non engagés dans la liaison entre le polymère et l'acide benzène-1,2,4,5 tétracarboxylique
 - et les liaisons covalentes étant établies entre les autres groupes carboxyliques de l'acide benzenetricarboxylique - à la fois non engagés dans la liaison entre l'acide benzène-1,2,4,5 tétracarboxylique et le polymère et non engagés dans les liaisons ioniques ci-dessus définies - et des groupes NH_2 de l'hémoglobine.

Les conjugués macromoléculaires obtenus par le procédé de l'invention présentent l'avantage d'être synthétisés facilement, sans formation ou presque de méthémoglobine, (inférieure à environ 5 %) et de n'impliquer qu'un nombre limité de réactions sur l'hémoglobine, ce qui évite sa dénaturation.

Par ailleurs, les conjugués macromoléculaires obtenus par le procédé de l'invention ne renferment pas d'effecteurs de petite masse moléculaire, non liés, qui entraînent dans les expériences in vitro une augmentation de la P_{50} , mais qui peuvent être facilement éliminés par diffusion extrarénale ou extravasculaire au cours des essais in vivo, et dont l'effet s'annule rapidement.

Les conjugués macromoléculaires obtenus par le procédé de l'invention présentent l'avantage de n'avoir pour l'oxygène qu'une affinité modérée, et d'avoir un volume hydrodynamique élevé, ce qui pendant les opérations transfusionnelles augmente la persistance intravasculaire de l'hémoglobine par suppression de l'hémoglobinurie.

Les conjugués d'hémoglobine liés irréversiblement à des polymères polyanioniques préparés selon l'invention peuvent, lorsqu'ils sont dissous dans des solutions aqueuses de composition convenable, jouer le rôle de substituts du sang, notamment dans des interventions nécessitant des transfusions ou la perfusion d'organe.

L'invention vise par conséquent, également les solutions aqueuses renfermant les conjugués obtenus selon les procédés décrits ci-dessus et notamment les solutions rendues isotoniques du sang, par dialyse prolongée contre une solution de Tyrode (de composition NaCl 8 g/l ; KCl 0,2 g/l ; CaCl_2 0,2 g/l ; MgCl_2 0,1 g/l ; NaH_2PO_4 0,05 g/l ; NaHCO_3 1 g/l ; D.glucose 1 g/l) par exemple et concentration par ultrafiltration jusqu'à obtenir pour l'hémoglobine, une concentration d'environ 7 %.

Des préparations de conjugués macromoléculaires d'hémoglobine obtenus par le procédé selon l'invention, ont été examinées en tant que transporteurs d'oxygène potentiels. On a pu montrer qu'elles sont effectivement capables de fixer l'oxygène réversiblement et en particulier de le restituer plus facilement que l'hémoglobine libre ainsi que l'illustrent les courbes d'affinité pour l'oxygène des produits décrits dans les exemples 1, 3 et 5 ci-après et représentés sur la figure 5 qui sera commentée ci-dessous. Il apparaît en effet, que ces préparations sont caractérisées par des pressions de demi-saturation (P_{50}) qui peuvent être très élevées (de 900 à 5 000 Pa) alors que dans les mêmes conditions (NaCl 0,05 M, pH 7, 25°C) celle de l'hémoglobine native est égale à environ 480 Pa.

Ainsi ces composés peuvent être utilisés pour fournir à des tissus ischémiés des quantités d'oxygène importantes. Ils peuvent également être utilisés en transfusion et être administrés à des patients, sous forme d'une solution aqueuse rendue isotonique du sang, en présence ou non d'excipients. Les composés peuvent aussi être lyophilisés en présence ou non d'un cryoprotecteur ou atomisés, et être redissous dans l'eau avant utilisation.

Les conjugués macromoléculaires obtenus par le procédé de l'invention ont été testés sur des souris relativement à la toxicité aiguë comme indiqué ci-après.

Les différents polymères polyanioniques décrits dans les exemples ont été injectés à des souris de souche SWISS dans les conditions suivantes : les polymères sont dissous dans de l'eau distillée à une concentration comprise entre 2,5 g et 5 g/l et le pH est ajusté à 7,4.

0,5 ml de chaque solution sont alors injectés par voie intrapéritonéale à 5 souris, dont le comportement est ensuite observé pendant une période de 7 jours. Ces essais n'ont permis de déceler aucun symptôme de toxicité aiguë.

L'invention a également pour objet de nouveaux conjugués macromoléculaires d'hémoglobine non

biodégradables ou peu biodégradables, pendant le temps durant lequel le conjugué macromoléculaire doit assurer des fonctions oxyphoriques dans le plasma, présentant pour l'oxygène une affinité inférieure à celle de l'hémoglobine libre, caractérisé en ce qu'il est constitué :

- d'une part par de l'hémoglobine, laquelle peut passer de façon réversible de la forme déoxygénée à la forme oxygénée, 5

- d'autre part par un polymère P hydrosoluble, non toxique, de préférence non antigénique, hémocompatible, de masse moléculaire d'environ 1 000 à environ 500 000, de préférence d'environ 1 000 à environ 100 000, comportant un ou plusieurs groupes polaires, de préférence des groupes hydroxyles, carboxyles ou amines, 10

- lequel polymère comporte des sites Z contenant d'une part au moins une charge négative portée par au moins un groupe choisi parmi les groupes suivants : sulfate, phosphate, carboxylate et destinée à créer une liaison ionique avec le polymère, et contenant d'autre part au moins un groupe carboxylique, aldéhyde ou OH, destiné à créer une liaison covalente avec le polymère, 15

- le polymère P étant relié à l'hémoglobine
 . d'une part par l'intermédiaire d'au moins une liaison ionique établie entre l'une au moins charges négatives des sites Z portés par le polymère P et l'hémoglobine, et 15

. d'autre part par l'intermédiaire d'au moins une liaison covalente établie, entre l'un au moins des groupes carboxyliques, aldéhyde ou OH du susdit site Z porté par le polymère P et l'hémoglobine, 20

- le nombre de liaisons covalentes entre le polymère et l'hémoglobine étant tel que le conjugué macromoléculaire a une masse moléculaire moyenne d'environ 70 000 à environ 1 000 000, de préférence d'environ 70 000 à environ 500 000, la relation entre le nombre et la nature des charges négatives, le nombre de sites et le nombre de monomères étant la suivante : 20

- lorsqu'il s'agit de site Z contenant un groupe anionique unique constitué d'un sulfate ou d'un phosphate, il y a au moins un tel site Z par chaîne de polymère et au plus un tel site Z tous les onze monomères, 25

- lorsqu'il s'agit de site Z contenant un groupe anionique unique constitué d'un carboxylate, non engagé dans la liaison entre le site et le polymère et non engagé dans la liaison covalente entre le polymère et l'hémoglobine, il y a au moins un tel site Z par chaîne de polymère, 25

- lorsqu'il s'agit de site Z contenant deux charges anioniques provenant de deux carboxylates, il y a au moins un tel site Z par chaîne de polymère et au plus un tel site Z tous les six monomères.

Cette classe de conjugués macromoléculaires nouveaux de l'invention se caractérise notamment :

- par le fait que l'une au moins des liaisons ioniques et l'une au moins des liaisons covalentes sont établies à partir de groupes respectifs appropriés situés sur le même site Z 30

- et par le fait qu'il y a au moins un seul site Z sus-défini par chaîne de polymère ; en d'autres termes, qu'un seul site Z sus-défini par chaîne suffit.

On a constaté que cette classe de nouveaux conjugués macromoléculaires présente des propriétés oxyphoriques intéressantes, alors que les conjugués macromoléculaires d'hémoglobine dans lesquels les conditions entre la nature, le nombre de charges anioniques sur un site Z, et le nombre de sites Z par chaîne de polymère sont les mêmes mais différent des conjugués définis ci-dessus par le fait que la liaison covalente est établie entre un groupe carboxylique, aldéhyde ou OH qui n'est pas situé sur le site Z (qui comporte le groupe anionique), présentent une activité oxyphorique peu ou pas intéressante. 35

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, tous les sites Z qui interviennent dans les liaisons covalentes entre le polymère et l'hémoglobine sont les mêmes que les sites Z qui interviennent dans les liaisons ioniques entre le polymère et l'hémoglobine. 40

Une classe avantageuse de conjugués macromoléculaires d'hémoglobine selon l'invention est constituée par ceux dans lesquels les liaisons covalentes entre le polymère P et l'hémoglobine sont établies entre au moins un groupe carboxylique ou aldéhyde ou OH porté par les sites Z et au moins une amine de l'hémoglobine située dans le site allostérique de l'hémoglobine, notamment l'amine de l'une au moins des deux valines β -terminales de l'hémoglobine. 45

Une autre classe avantageuse de conjugués macromoléculaires d'hémoglobine selon l'invention est constituée par ceux dans lesquels les ponts salins entre les groupes NH_3^+ et les groupes COO^- internes de l'hémoglobine sont intacts lorsque l'hémoglobine est sous forme déoxygénée. 50

Une autre classe avantageuse de conjugués macromoléculaires selon l'invention est constituée par ceux dans lesquels le polymère P est choisi parmi les polysaccharides, notamment les hydroxyalkylamidons dont la radical alkyle comporte de 2 à 4 atomes de carbone, l'inuline, le dextrane et ses dérivés, notamment le dextrane aminé, l'alcool polyvinylique, la polyvinylpyrrolidone, le polyméthacrylate et ses dérivés, les polypeptides, les polyalkylène glycols dans lesquels le groupe alkylène comporte de 2 à 5 atomes de carbone, notamment le polyéthylène glycol et le polypropylène glycol. 55

Une autre classe avantageuse de conjugués macromoléculaires selon l'invention est constituée par ceux dans lesquels le polymère P a une masse moléculaire moyenne inférieure ou égale à 70 000, lorsqu'il est constitué par le dextrane et ses dérivés, et une masse moléculaire inférieure ou égale à 10 000 lorsqu'il est choisi parmi les polyalkylène glycols, la polyvinylpyrrolidone ou le polyméthacrylate. 60

Une autre classe avantageuse de conjugués macromoléculaires selon l'invention est constituée par ceux dans lesquels le site Z est relié au polymère par l'intermédiaire d'une fonction ester, éther, amide ou amine.

Une autre classe avantageuse de conjugués macromoléculaires selon l'invention est constituée par ceux dans lesquels le site Z comporte des groupes OSO_3H , OPO_3H_2 , $\text{O-CH}(\text{COOH})_2$, $-\text{O-CH}(\text{COOH})-\text{CH}_2-\text{COOH}$, 65